

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12P 7/64, C12N 1/14, A23K 1/00 // (C12P 7/64, C12R 1:645) (C12N 1/14, C12R 1:645)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/39468</p> <p>(43) 国際公開日 1998年9月11日(11.09.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00891</p> <p>(22) 国際出願日 1998年3月4日(04.03.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/49337 1997年3月4日(04.03.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP] 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 鈴木 修(SUZUKI, Osamu)[JP/JP] 〒739-0045 広島県東広島市鏡山北317-3 下見職員宿舎1-501 Hiroshima, (JP) 小埜和久(ONO, Kazuhisa)[JP/JP] 〒739-2115 広島県東広島市高屋高美が丘4-14-9 Hiroshima, (JP) 重田征子(SHIGETA, Seiko)[JP/JP] 〒739-0443 広島県佐伯郡大野町沖塩屋2-9-13 Hiroshima, (JP) 秋 庸裕(AKI, Tsunehiro)[JP/JP] 〒739-0021 広島県東広島市西条町助実24-2-403 Hiroshima, (JP)</p>		<p>秋元健吾(AKIMOTO, Kengo)[JP/JP] 〒618-0001 大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-1006 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: PROCESS FOR PREPARING HIGHLY UNSATURATED FATTY ACID AND LIPID CONTAINING HIGHLY UNSATURATED FATTY ACID</p> <p>(54)発明の名称 高度不飽和脂肪酸及びこれを含有する脂質の製造方法</p> <p>(57) Abstract A process for preparing a highly unsaturated fatty acid, characterized by culturing a microorganism belonging to the genus Mortierella and resistant to a carbon source in a medium having a carbon source concentration of at least 4 % by weight at the time of the initiation of the culture and harvesting a highly unsaturated fatty acid from the culture. Culturing for about one week can provide a highly unsaturated fatty acid in an amount of at least about 7 g/l.</p>		

(57) 要約

炭素源に対して耐性を有するモルティエラ属微生物を培養開始時の炭素源濃度が4重量%以上の培地中で培養し、該培養物から高度不飽和脂肪酸を採取することを特徴とする、高度不飽和脂肪酸の製造方法。約1週間の培養で約7 g/L以上の高度不飽和脂肪酸が得られる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパブリック第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SD	スーダン
AT	オーストリア	GB	イギリス	MC	モナコ	TD	チャド
AZ	アゼルバイジャン	GE	ジョージア	MD	モルドバ	TG	トーゴ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バハマ	GU	グアム	MK	マケドニア	TT	トリニダード・トバゴ
BE	ベルギー	HN	ホンジュラス	ML	マリ	UA	ウクライナ
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	SZ	スワジランド
CC	ココス (パプアニューギニア)	IS	アイスランド	MX	メキシコ	TC	タークス・カコス
CH	スイス	IT	イタリア	NE	ニジェール	TD	チャド
CL	チリ	JP	日本	NL	オランダ	TT	トリニダード・トバゴ
CM	カメルーン	KE	ケニア	NO	ノルウェー	UA	ウクライナ
CO	コロンビア	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	UG	ウガンダ
CR	コスタリカ	KG	キルギス	PL	ポーランド	US	米国
CU	キューバ	KK	カザフスタン	PT	ポルトガル	SZ	スワジランド
CY	キプロス	KL	マレーシア	RO	ルーマニア	TC	タークス・カコス
CZ	チェコ	LR	リベリア	RU	ロシア	TD	チャド
DE	ドイツ	LL	リベリア	SE	スウェーデン	TM	トルクメニスタン
EE	エストニア	LS	レソト	SG	シンガポール	TT	トリニダード・トバゴ
				SK	スロバキア	UA	ウクライナ
				SI	スロベニア	UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ
						UG	ウガンダ
						US	米国
						SZ	スワジランド
						TC	タークス・カコス
						TD	チャド
						TM	トルクメニスタン
						TT	トリニダード・トバゴ
						UA	ウクライナ

## 明 細 書

## 高度不飽和脂肪酸及びこれを含む脂質の製造方法

## 発明の分野

本発明は、高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物、該微生物を用いた醗酵法によるアラキドン酸、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸及びそれらを含む脂質の製造方法並びに該微生物を含む動物用飼料に関する。

## 背景技術

アラキドン酸 (5、8、11、14-エイコサテトラエン酸) や、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸 (8、11、14-エイコサトリエン酸)、エイコサペンタエン酸 (5、8、11、14、17-エイコサペンタエン酸) は、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン等のエイコサノイドの前駆体となり得るほか、その脂肪酸自身のもつ生理活性からも注目されている。例えばエイコサペンタエン酸は血栓防止作用あるいは脂質低下作用に基づいて健康食品や医薬品として市販されている。

またアラキドン酸は、近年、ドコサヘキサエン酸と同じく母乳中に含まれており、乳児の発育に役立つとの報告がある (「Advances in Polyunsaturated Fatty Acid Research」, Elsevier Science Publishers, 1993, pp. 261-264)。さらに、胎児の身長や脳の発育における重要性が報告されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1073-1077 (1993), Lancet, 344, 1319-1322 (1994))。

このようなアラキドン酸、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸又はエイコサ

ペンタエン酸の製造方法としては、モルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物を使用して、従来よりも高収率で得る方法が開発されている (特公平 7-34752、特開平 6-153970、特開平 8-214893、Chapter 4 in Industrial Applications of Single Cell Oil, ed. by D.J. Kyle and C. Ratledge, American Oil Chemists' Society, Illinois, 1992、WO 96/21037、特公平 7-22513、特公平 7-12315、特開平 1-243992)。

しかしながらここで使用されているモルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物は、いずれも高グルコース濃度に対する耐性が低く、実際の通気攪拌培養での工業生産ではグルコースの濃度が 2 重量%~4 重量%となるようにグルコースの流加培養を実施しているのが現状であり、製造工程が煩雑になってしまうという問題点があった。また従来アラキドン酸、ジホモγーリノレン酸又はエイコサペンタエン酸に使用されているモルティエセラ (Mortierella) 属モルティエセラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物は、γーリノレン酸の製造に用いられているモルティエセラ (Mortierella) 属マイクロムコール亜属 (Subgenus Micoromucor) に属する微生物と比較して、明らかに菌の生育度 (培地あたりの乾燥菌体重量) が低く、その結果、培地当たりで得られる高度不飽和脂肪酸を含有する脂質の生産量は低いものであった (例えば、モルティエセラ亜属に属する Mortierella alpina の生育度が 22.5 g/L に対して、マイクロムコール亜属に属する Mortierella ramanniana var. angulispora の生育度は 79 g/L に達している (Chapter 5, Chapter 7 in Industrial Applications of Single Cell Oil, ed. by D.J. Kyle and C. Ratledge, American Oil Chemists' Society, Illinois, 1992) )。

モルティエセラ属モルティエセラ亜属に属する微生物のアラキドン酸の生産性に関して、これまでに、例えば特開平 6 - 1 5 3 9 7 0 の実施例では、初発グルコース濃度 2 %、培養 7 日間で 4 . 0 9 g/L のアラキドン酸が生産されることが、また特開平 8 - 2 1 4 8 9 3 の実施例では、初発グルコース濃度 4 . 3 %、培養 3 日間で 2 . 3 g/L のアラキドン酸が生産されることが、それぞれ開示されている。

炭素源の濃度を高めた培地用いた例としては、「Chapter 4 in Industrial Applications of Single Cell Oil, ed. by D. J. Kyle and C. Ratledge, American Oil Chemists' Society, Illinois, 1992」の実験結果では、初発デキストロース濃度 9 . 8 %、培養 7 日間で 1 . 5 g/L、初発デキストロース濃度 9 . 8 %、培養 1 6 日間で 9 . 1 g/L のアラキドン酸が生産されているが、初発デキストロース濃度が高いため特に菌の生育が悪く、培養 7 日目でのアラキドン酸生産量はわずか 1 . 5 g/L と低く、生産量を確保するために培養日数を 1 6 日間としている。

また、WO 9 6 / 2 1 0 3 7 の実施例では、初発グルコース濃度 1 0 %、培養 8 日間で 5 . 3 g/L のアラキドン酸が生産されているが、高グルコース濃度に対する菌の生育阻害を抑制する目的で、pH コントロール、塩類添加などの手法を駆使しており、煩雑な操作が必要である。

このように、微生物を用いた醗酵法による物質の生産では、一般に生産性を高めようとする場合には微生物の生育量を増やすか、微生物当たりの生産量を増やすなどの方法が取られる。微生物生育のための栄養源となる炭素源の濃度を高めることは微生物の生育量を増やすことにつながり、出来るだけ高い炭素源の濃度での培養が好ましい。しかし一方で、炭素源の濃度を高くすることは、微生物の

生育にとって浸透圧の関係で過酷な条件となり、炭素源の濃度を高くすることは微生物の生育を抑制することになってしまう。

前述の、初発のグルコース濃度を高めた場合には菌の生育が悪くなり7日間の培養ではアラキドン酸の生産量は1.5 g/L程度しか得られ例や、初発のグルコース濃度を高めるためにpHコントロールや塩類添加などを行って培地の調整を行っている例は、微生物を用いた醗酵法による物質生産の難しさを示している例と見ることもできる。

従って、高濃度の炭素源に対する耐性があり、初発のグルコース濃度を高めた培地中でも十分な生育度を有する微生物を見出し、これを用いてアラキドン酸、ジホモγーリノレン酸又はエイコサペンタエン酸を簡便な操作で効率良く、かつ大量に製造する方法を開発することが望まれていた。

#### 発明の開示

従って本発明は、高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物を利用して、アラキドン酸、ジホモγーリノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸又はそれらを含む脂質の効率的な製造方法、並びに高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物、及び該微生物を含む動物用飼料を提供しようとするものである。

本発明者等は、上記の目的を達成するために種々研究した結果、高濃度の炭素源に対する耐性があり、培養開始時の炭素源濃度を高めた培地中でも菌の生育度が高く、その結果としてアラキドン酸、ジホモγーリノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸又はそれらを含む脂質の生産性が高まったモルティエセラ属に属する微生物を見だし本発明を完成した。

より具体的には、pH制御、無機塩類添加などの煩雑な操作を駆使せず、炭素源としてグルコース、窒素源として酵母エキスをを用いた単純な培地で、アラキドン酸、ジホモγーリノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸の生産に従来使用されているモルティエラ属モルティエラ亜属に属する微生物 (*Mortierella alpina* IF0 8568)では菌の生育度が低下する炭素源濃度である4重量%以上、より特徴的には、ほとんど菌の生育が認められない炭素源濃度である8重量%以上、さらには11%以上であっても菌の生育度が高く、その結果としてアラキドン酸、ジホモγーリノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸又はそれらを含む脂質の生産性が高まったモルティエラ属に属する新しい微生物を見だし本発明を完成した。

従って本発明は、高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエラ (*Mortierella*) 属に属する微生物を培養開始時の炭素源濃度が4重量%以上の培地中で培養して、アラキドン酸又はこれを含む脂質を生成せしめ、そしてアラキドン酸又はこれを含む脂質を採取することを特徴とするアラキドン酸又はこれを含む脂質の製造方法を提供する。

即ち、本発明によれば、高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエラ (*Mortierella*)属に属する微生物を、培養開始時の炭素源濃度が4重量%以上の培地中で培養することにより、8日間の培養で7 g/L以上のアラキドン酸を製造することが出来る。培養開始時の炭素源濃度をさらに高めるとともに培養中に炭素源を流加することによりアラキドン酸の生産性を更に向上させることが出来る。例えば、培養開始時の炭素源濃度を8重量%以上とすると約10 g/L以上のアラキドン酸を製造でき、培養開始時の炭素源濃度を11重量%以上とすることにより、約14 g/L以上のアラキドン酸を

製造できる。これは、これまで知られていたモルティエセラ属の微生物を用いたアラキドン酸の生産性  $5.3 \text{ g/L}$  (W096/21037) の約 3 倍の生産性である。

本発明はまた、高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物を、 $\Delta 5$  不飽和化酵素阻害剤を含有する培地中で培養して、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸又はこれを含有する脂質を生成せしめ、そしてジホモ- $\gamma$ -リノレン酸又はこれを含有する脂質を採取することを特徴とするジホモ- $\gamma$ -リノレン酸又はこれを含有する脂質の製造方法を提供する。

本発明はまた、高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物を、 $20^\circ\text{C}$  以下で培養して、エイコサペンタエン酸又はこれを含有する脂質を生成せしめ、そしてエイコサペンタエン酸又はこれを含有する脂質を採取することを特徴とするエイコサペンタエン酸又はこれを含有する脂質の製造方法を提供する。

本発明はまた、高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物を含んでなる動物用飼料を提供する。

本発明はまた、高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエセラ属 SAM 2 1 9 7 株 (FERM BP-6 2 6 1) を提供する。

#### 発明の実施の形態

本発明で使用される高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物とは、モルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物であって、培養開始時の炭素源濃度が 4 % 以上、好ましくは 8 % 以上、より好ましくは 11 % 以上で、培養開始時の窒素源濃度が 2 % 以上である液体培地を用いて通気攪拌



培養により常法に従って培養を2～12日間、好ましくは5～12日間、より好ましくは5～10日間行ったとき、培地あたり、アラキドン酸を7g/L以上生産できる能力を有する微生物である。

このような特徴を有するモルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物を用いることによって、培養条件や培地への添加物によっては、アラキドン酸の他、ジホモマーリノレン酸又はエイコサペンタエン酸も従来より高収率で得ることができる。

なおモルティエレラ (Mortierella) 属には、モルティエレラ亜属 (Subgenus Mortierella) とマイクロムコール亜属 (Subgenus Micromucor) があることが知られており、アラキドン酸、ジホモマーリノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸の製造にはモルティエレラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物が望ましい。

またモルティエレラ亜属 (Subgenus Mortierella) には、アルピナ区 (Section Alpina)、フィグロフィラ区 (Section Hygrophila)、モルティエレラ区 (Section Mortierella)、シュマッカーリ区 (Section Schmuckeri)、シンプレックス区 (Section Simplex)、スピノサ区 (Section Spinosa)、スチロスポラ区 (Section Stylospora) 等があることが知られており、アラキドン酸、ジホモマーリノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸の製造にはアルピナ区 (Section Alpina) に属する微生物が望ましい。

またアルピナ区 (Section Alpina) にはアルピナ (alpina) 種やアリアセア (alliacea) 種等があることが、フィグロフィラ区 (Section Hygrophila) にはエロンガタ (elongata) 種やミニヌティッシマ (minutissima) 種等があることが、モルティエレラ区 (Section Mortierella) にはポリセファラ (polycephala) 種等があることが、スチロスポラ区 (Section Stylospora) にはバーティ

シラタ (verticillata) 種等があることが知られている。

具体的な菌株としては、例えば本発明者らによって土壌から分離され、ブダペスト条約に基き工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、1997年3月3日に、菌株 *Mortierella* sp. SAM 2197 株（FERM BP-6261号）として国際寄託された微生物を使用することができる。

*Mortierella* sp. SAM 2197 株は下記の菌学的性質を有する。

培養性状（25℃、5日間、暗黒下で培養）

L c A 培地（Glucose 1g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g, KCl 0.2g,  $\text{NaNO}_3$  2g, Yeast extract 0.2g, Agar 13g, Distilled Water 1,000ml, pH 6.5~7.0）：

コロニーの直径は65mm。コロニーは白色。わずかに気生菌糸を形成する。

コーンミール寒天培地（Difco 社、カタログ番号：0386-02-2）：

コロニーの直径は50mm。ややバラの花弁状を呈する。コロニーは白色。わずかに気生菌糸を形成する。

形態学的特徴

気生菌糸から胞子のう柄を形成する。胞子のう柄は長さ60~120 $\mu\text{m}$ 。胞子のう柄は分岐しない。胞子のう柄は基部から先端に向けて先細るが胞子のう直下の所でわずかに幅を増す。胞子のう柄基部はしばしば不規則な形態に膨大する。胞子のう柄の先端に無色の胞子のうが形成される。胞子のうが離脱した胞子のう柄の先端には明瞭なカラーが観察される。胞子のうは数個あるいは多数の胞子のう胞子を含む。

多数の胞子のう胞子を含む胞子のうは亜球形で、直径は約15 $\mu$

m、胞子のう胞子は、単細胞で楕円形、無色、長さ  $3 \sim 5 \mu\text{m}$ 、幅  $1.5 \sim 2.5 \mu\text{m}$ 。数個の胞子のう胞子を含む胞子のうは不規則な形態をとる。楕円形、垂球形あるいは不規則な形態の壁の薄い厚膜胞子を形成する。

上記の結果から、SAM 2197 株は、*Mortierella* 属 *Mortierella* 垂属に属するものと同定された。

本発明の高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエレラ (*Mortierella*) 属に属する微生物は、以下に示す培養条件及び培養方法で培養することができる。

本発明に使用される菌株を培養する為には、その菌株の胞子、菌糸、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール、クエン酸、コーンスターチ等の一般的に使用されているものがいずれも使用できるが、特にグルコース、フラクトース、マルトース、グリセロール、クエン酸、コーンスターチが好ましい。

窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンステープリカー、大豆タンパク等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源等の一般的に使用されているものを用いることができる。この他必要に応じて微量栄養源として用いる、リン酸カリウム、リン酸二水素カリウム等のリン酸塩、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅、塩化マグネシウム、塩化カリウム等の無機塩及びビタミン等全て一般的に使用されているものがいずれも使用できる。

また本発明においては、培地中に目的とするアラキドン酸、ジホ

モーラーリノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸の基質を添加することにより、該高度不飽和脂肪酸の蓄積を促進することもできる。この基質として、例えば、ヘキサデカン若しくはオクタデカンのごとき炭化水素；オレイン酸若しくはリノール酸のごとき脂肪酸又はその塩、例えばナトリウム塩若しくはカリウム塩、又は脂肪酸エステル、例えばエチルエステル、グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル；又はオリーブ油、大豆油、なたね油、綿実油若しくはヤシ油のごとき油脂類を単独で、又は組み合わせて使用できる。しかし、これらに限られるものではない。基質の総添加量は培地に対して0.001～10重量％、好ましくは0.5～10重量％である。またこれらの基質を唯一の炭素源として培養してもよく、この場合には必要に応じてさらに添加量を増加させる。

上記の炭素源、窒素源、無機塩類、ビタミン及び／又は基質等の培地成分は、培養開始前の培地及び／又は培養中の培養液に添加することができる。これらの成分は一度に添加することもでき、又は連続的に、若しくは複数回に分けて経時的に添加することもできる。これらの培地成分は各々単独で、又は予め混合して添加することができる。これらの培地成分の内、無機塩類、ビタミン類及び／又は基質等の培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はなく、一般的に使用される範囲で用いればよい。

一方、炭素源は、培養開始時の培地中の炭素源濃度を4重量％以上、好ましくは8重量％以上、より好ましくは11重量％以上とする。これによって培養操作の簡素化をはかることができるようになり、さらに培養中の培養液に添加する場合にも、炭素源を2重量％以上、好ましくは4重量％以上、より好ましくは6重量％以上の濃度で流加することが可能となることから、更に効率良く菌の増殖並びに目的とする高度不飽和脂肪酸の生産を行うことができる。

また窒素源の総添加量は、0.01～10重量%、好ましくは0.1～10重量%の濃度とするのが良い。また培養開始時の培地中の窒素源濃度は2重量%以上とすることができ、また培養途中の培養液に窒素源を流加することもできる。

培養温度は5～40℃、好ましくは20～30℃とし、また20～30℃にて培養して菌体を増殖せしめた後5～20℃にて培養を続けて目的とする高度不飽和脂肪酸を生産せしめる。このような温度管理により、生成脂肪酸中の高度不飽和脂肪酸の比率を上昇せしめることができる。培地のpHも特に制御する必要はなく、通常用いるpHの範囲である4～10、好ましくは6～9として通気攪拌培養、振盪培養、又は静置培養を行う。特に液体培地を用いた通気攪拌培養は、目的とする高度不飽和脂肪酸を効率よく製造するのに好ましい。培養は通常2～12日間、好ましくは5～12日間、より好ましくは5～10日間行う。

培養温度を培養開始時よりあるいは培養途中より20℃以下にすることでエイコサペンタエン酸を産生することができる。また、エイコサペンタエン酸の前駆体である $\alpha$ -リノレン酸あるいは $\alpha$ -リノレン酸を含有する脂質（例えば、亜麻仁油、シソ油など）を培地に添加すればエイコサペンタエン酸が効率的に産生されるし、培養温度を20℃以下にすることで、さらに生産性が向上する。

固体培養で培養する場合は、固形物重量に対して50～100重量%の水を加えたふすま、もみがら、米ぬか等を用い、5～40℃、好ましくは前記の温度において、3～14日間培養を行う。この場合に必要に応じて培地中に窒素源、無機塩類、微量栄養源を加えることができる。

またジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の生産量を増加せしめるためには、本発明の微生物を $\Delta 5$ 不飽和化酵素阻害剤の存在下で培養するのが

好ましい。Δ 5 不飽和化酵素阻害剤としては、セサミン、セサミノール、エピセサミン、エピセサミノール、セサモリン、2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ[3. 3. 0]オクタン、2, 6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ[3. 3. 0]オクタン又は2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3, 7-ジオキサビシクロ[3. 3. 0]オクタン等のリグナン類化合物；ピペロニルブトキサイド；クルクミン；胡麻油；落花生油；香辛性植物、例えばタラゴン (Tarragon)、イノンド種子 (Dill Seed)、パセリ (Parsley)、ウコン (Turmeric)、ナツメグ (Nutmeg) 等からの抽出物；五加皮の抽出物；桐木の抽出物；白果樹皮の抽出物；ヒハツの抽出物；細辛の抽出物；胡麻油、胡麻油製造過程の副産物（例えば胡麻種子の脱脂粕、胡麻油の脱臭スカム等）、胡麻種子等からの抽出物などを使用することができる。

なお、胡麻油、胡麻油製造過程の副産物（例えば胡麻種子の脱脂粕、胡麻油の脱臭スカム等）、胡麻種子等からの抽出物は、胡麻油とは実質的に非混和性であり且つΔ 5 不飽和化酵素阻害活性を有する成分を抽出・溶解することのできる種々の有機溶剤を用いて調製することができる。このような有機溶剤として、例えばアセトン、メチルエチルケトン、ジエチルケトン、メタノール、エタノール等を挙げることができる。また溶媒抽出だけでなく水蒸気蒸留や分子蒸留等によって分離されたものも抽出物に含まれる。また上記香辛性植物からの抽出物は、常用の溶剤（例えばジクロロメタン、エタノール、メタノール、エチルエーテル等）を用いて調製することができる。

上記Δ5不飽和化酵素阻害剤の培地への添加量はおよそ次の通りである。胡麻油又は落花生油、あるいはこの両者の総添加量は培地に対して0.001～10重量%、好ましくは0.5～10重量%である。上記胡麻油、胡麻油製造過程の副産物（例えば胡麻種子の脱脂粕、胡麻油の脱臭スカム等）、胡麻種子等からの抽出物を添加する場合、その添加量は培地に対して $3 \times 10^{-3}$ ～ $3 \times 10^{-1}$ 重量%である。

また、セサミン、セサミノール、エピセサミン、エピセサミノール等のリグナン類化合物を添加する場合、その添加量（これらの2種類以上を組み合わせる場合はその合計量）は、培地に対して $1 \times 10^{-3}$ ～ $1 \times 10^{-1}$ 重量%である。これらの添加物類は生産微生物を接種する前又はその直後の培地に加えてもよく、又は培養を開始した直後の培地に加えてもよく、あるいは両時点で加えてもよい。培養開始後の添加は1回でもよく、又は複数回に分けて間欠的に添加してもよい。

このようにして培養して、菌体内にアラキドン酸、ジホモγーリノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸を大量に含有する脂質が生成蓄積される。

目的とする高度不飽和脂肪酸は、培養によって脂質を製造する途中の培養液若しくはその殺菌した培養液、または培養終了後の培養液若しくはその殺菌した培養液、またはそれぞれから集菌した培養菌体若しくはその乾燥物から常法に従って得ることができる。液体培地を使用した場合には、培養菌体から、例えば、次のようにして目的とする高度不飽和脂肪酸の採取を行う。

培養終了後、培養液より遠心分離及び／又は濾過等の常用の固液分離手段により培養菌体を得る。該菌体は好ましくは、水洗、破碎、乾燥する。乾燥は、凍結乾燥、風乾等によって行うことができる。

。乾燥菌体は、好ましくは窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、又メタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができ、好ましくはヘキサンを用いて抽出する。

抽出物から減圧下で有機溶媒を留去することにより、高濃度の高度不飽和脂肪酸を含有した脂質が得られる。また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。この場合にはメタノール、エタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び／又は他の溶媒とからなる水に対して相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。

上記のようにして得られた脂質中には、各種高度不飽和脂肪酸が脂質化合物、例えば脂肪の構成成分として含まれている。これらを直接分離することもできるが、低級アルコールとのエステル、例えばジホモ- $\gamma$ -リノレン酸メチル、アラキドン酸メチル、エイコサペンタエン酸メチル等として分離するのが好ましい。このようなエステルにすることにより、他の脂質成分から容易に分離することができ、また、培養中に生成する他の脂肪酸、例えばパルミチン酸、オレイン酸等（これらも、高度不飽和脂肪酸のエステル化に際してエステル化される）から容易に分離することができる。例えば、高度不飽和脂肪酸のメチルエステルを得るには、前記の抽出脂質を無水メタノール-塩酸 5 ~ 10 %、BF<sub>3</sub> -メタノール 10 ~ 50 % 等により、室温にて 1 ~ 24 時間処理するのが好ましい。

前記の処理液から高度不飽和脂肪酸メチルエステルを回収するにはヘキサン、エーテル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出するのが好ましい。次に、この抽出液を無水硫酸ナトリウム等により乾燥し、



有機溶媒を好ましくは減圧下で留去することにより主として脂肪酸エステルからなる混合物が得られる。こうして得られる脂肪酸エステルの混合物には、目的とする高度不飽和脂肪酸メチルエステルの他に、パルミチン酸メチルエステル、ステアリン酸メチルエステル、オレイン酸メチルエステル、 $\gamma$ -リノレン酸メチルエステル等の脂肪酸メチルエステルが含まれている。

これらの脂肪酸メチルエステル混合物から高度不飽和脂肪酸メチルエステル、すなわち本来の目的としてのジホモ- $\gamma$ -リノレン酸メチルエステル、アラキドン酸メチルエステル、エイコサペンタエン酸メチルエステルを単離するには、カラムクロマトグラフィー、低温結晶化法、尿素包接法、液々向流分配クロマトグラフィー等を単独で、又は組み合わせて使用することができる。

こうして単離された各種高度不飽和脂肪酸メチルから高度不飽和脂肪酸を得るには、アルカリで加水分解した後、エーテル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出すればよい。

また、高度不飽和脂肪酸をそのメチルエステルを経ないで採取するには、前記の抽出脂質をアルカリ分解（例えば5%水酸化ナトリウムにより室温にて2～3時間）した後、この分解液から、脂肪酸の抽出・精製に常用されている方法により抽出・精製することができる。

本発明の高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物を培養することによって得られる脂質は、種々の動物用飼料又は食品などの製品に利用することができる。脂質を製品に利用するにあたっては、培養菌体から採取した脂質またはそれを精製して得られる脂質を使用することができるが、該脂質を菌体培養によって製造する途中の培養液若しくはその殺菌した培養液、または培養終了後の培養液若しくはその殺菌した培養液、

またはそれぞれから集菌した培養菌体若しくはその乾燥物、または培養液もしくは菌体から該油脂を採取した後の該油脂を含有する残渣も使用することができる。

本発明は、本発明の微生物の菌体を配合した動物用飼料に関する。本発明の動物用飼料としては、ドッグフードやキャットフードなどのペットフード、鶏などの家禽のための飼料、豚や牛などの家畜のための飼料、養魚用飼料などが挙げられる。また、脂質を産生、蓄積した微生物の菌体は、脂質が菌体内に保護されているため酸化されにくく、また加熱殺菌にも安定であるため好ましく、培養菌体から脂質を採取した後の残渣も、本発明の脂質の他に蛋白質や灰分、炭水化物などを含んでいるため好ましい。なお動物用飼料は、本発明の微生物菌体のほか、他の原料と組み合わせて加工することもできる。

さらに、本発明の微生物の菌体及びそれから得られる脂質は動物用飼料添加物としても使用できる。

さらに、脂質を産生、蓄積した培養菌体または培養液を含んでなる微小餌料生物用餌料として用いることもできる。従来、魚貝類や甲殻類の養殖において、種苗（稚仔魚）生産には、微小餌料生物（シオミズツボムシ、ブラインシュリンプなどの動物プランクトン）が用いられており、稚仔魚の養殖には先ずこれらの微小生物を養殖する必要がある。これらの微小生物を養殖する場合には、後にそれを餌料として摂取する稚仔魚の栄養要求性を考えて微小餌料生物に与える餌料が決められる。脂質を含有する培養菌体または培養液を微小餌料生物に与えることにより、アラキドン酸、ジホモγーリノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸を含有し、稚仔魚の栄養要求性を満足できる微小餌料生物が得られる。

この他、上記の微小餌料生物を含有する魚介類用餌料とすること

もできる。

本発明で得られる脂質は、アラキドン酸、ジホモ $\gamma$ -リノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸を強化した家禽卵の生産に利用すること、並びにアラキドン酸、ジホモ $\gamma$ -リノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸を強化した卵黄油の製造に利用することもできる。アラキドン酸、ジホモ $\gamma$ -リノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸を強化した家禽卵は、上述の動物飼料を採卵用家禽、特に鶏に与え飼育することによって産生される。また該家禽卵、特に卵黄から常法にしたがって油脂を抽出することによって、アラキドン酸、ジホモ $\gamma$ -リノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸を強化した卵黄油が得られる。またこの卵黄油を乳児用調製乳、未熟児用調製乳、幼児用食品、妊産婦用食品に添加することもできる。

脂質、好ましくはトリグリセリド油を含有する乳児用調製乳、未熟児用調製乳、幼児用食品、妊産婦用食品、老人用食品、栄養補助食品、健康食品等の食品に本発明で得られる脂質を利用することもできる。本発明の食品は、アラキドン酸、ジホモ $\gamma$ -リノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸を補うことを目的とし、健康維持等に用いられる。その形態は、固形、あるいは液状の食品ないしは嗜好品のいずれであってもよい。

例えば油脂を含む食品として肉、魚、ナッツ等の油脂を含む天然食品、中華料理、ラーメン、スープ等の調理時に油脂を加える食品、天ぷら、フライ、油揚げ、チャーハン、ドーナッツ、かりん糖等の熱媒体として油脂を用いた食品、バター、マーガリン、マヨネーズ、ドレッシング、チョコレート、即席ラーメン、キャラメル、ビスケット、クッキー、ケーキ、アイスクリーム等の油脂食品又は加工時に油脂を加えた加工食品、おかき、ハードビスケット、あんパ

ン等の加工仕上げ時に油脂を噴霧又は塗布した食品等を挙げることができるが、油脂を含む食品に限定しているわけではなく、例えばパン、めん類、ごはん、菓子類（キャンデー、チューインガム、グミ、錠菓、和菓子）、豆腐およびその加工品などの農産食品、清酒、薬用酒、みりん、食酢、醤油、味噌などの発酵食品、ヨーグルト、ハム、ベーコン、ソーセージなどの畜農食品、かまぼこ、揚げ天、はんぺんなどの水産食品、果汁飲料、清涼飲料、スポーツ飲料、アルコール飲料、茶などの飲料等を挙げることができる。

食品に用いる場合には、所定量の脂質を、食品原料とともに配合し、一般の製造法により加工製造することができる。その配合量は剤形、食品の形態性状により異なるが、一般には食品全量に対して 0.001～50 重量%が好ましいが特に限定されるものではない。

本発明で得られる脂質はまた、脂質を含有する機能性食品とすることもできる。機能性食品は、アラキドン酸、ジホモγーリノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸が有する生理活性機能を発揮することを目的とし、機能低下した状態を健康状態に戻し維持するための、あるいは機能低下を予防するための食品である。

形態としては散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、トローチ、内用液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、ドリンク剤、経腸栄養剤等の形態であっても、また例えば蛋白質（蛋白質源としてはアミノ酸バランスのとれた栄養価の高い乳蛋白質、大豆蛋白質、卵アルブミン等の蛋白質が最も広く使用されるが、これらの分解物、卵白のオリゴペプチド、大豆加水分解物等の他、アミノ酸単体の混合物も使用される）、糖類、脂肪、微量元素、ビタミン類、乳化剤、香料等に本発明の脂肪酸が配合された自然流動食、半消化態栄養食および成分栄養食等の形態、あるいは前記飲食品の形態であってもよい。

機能性食品、栄養補助食品は、脂質を用いて、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、トローチ、内用液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、ドリンク剤、自然流動食、半消化態栄養食、成分栄養食、経腸栄養剤等の形態を有する飲食品として製造することができる。この際、脂質とともにいずれの栄養成分あるいは機能性成分を配合してもよい。また医師の指示に基づく栄養士の管理下に、病院給食の調理の際に本発明で得られる脂質を加え、その場で調整した食事を、アラキドン酸、ジホモγーリノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸の供給を必要としている患者に与えることもできる。

## 実施例

次に、実施例によりこの発明を具体的に説明する。

### 実施例 1. 高濃度の炭素源に対する耐性の評価

(1) グルコース 1 %、酵母エキス 0.5 %、(2) グルコース 2 %、酵母エキス 1 %、(3) グルコース 3 %、酵母エキス 1.5 %、(4) グルコース 4 %、酵母エキス 2 %、(5) グルコース 5 %、酵母エキス 2.5 %、(6) グルコース 8 %、酵母エキス 1.6 %を含む培地 (pH 6.3) 10 ml を 50 ml エルレンマイヤーフラスコにそれぞれ入れ、120 °C で 20 分間殺菌した。

モルティエラ属 SAM 2197 株 (FERM BP-6261) を Czapek 寒天培地 (0.2 % NaNO<sub>3</sub>、0.1 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.05 % MgSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O、0.05 % KCl、0.001 % FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、3 % Sucrose、2 % 寒天、pH 6.0) スラントに植菌し、孢子形成スラントを調製した。孢子形成スラントに滅菌水 8 ml を入れ、攪拌した後、孢子溶液を 100 μl 植菌した。

レシプロシェーカー (110 rpm) により 28 °C で 6 日間培養した。培養後、濾過により菌体を回収し、十分水洗した後、105 °C

で2時間乾燥させ、乾燥菌体重量を求め生育度（g/L）を算出した。得られた乾燥菌体20mgに塩化メチレン2ml、無水メタノール-塩酸（10%）2mlを加え、50℃で3時間処理することによってメチルエステル化し、n-ヘキサン4ml、水1mlを加えて、2回抽出し溶剤を遠心エバポレーター（40℃、1時間）で留去した後、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。表1にその結果を示す。

表 1

グルコース濃度 (%)	1	2	3	4	5	8
酵母エキス濃度 (%)	0.5	1	1.5	2	2.5	1.6
生育度 (g/L)	5.17	8.98	14.16	20.22	24.93	25.13
全脂肪酸生産量 (mg/g 乾燥菌体)	55.1	119.8	70.4	125.7	135.5	179.3
アラキドン酸 含有率 (%)	25.9	35.1	30.2	47.8	53.8	43.3
アラキドン酸 生産量 (g/L)	0.07	0.38	0.30	1.22	1.82	1.95

初発グルコース濃度を高める程生育度が向上しており、高濃度の炭素源に対し耐性を有していることがわかり、また初発グルコース濃度が4%以上での、アラキドン酸の生産性の向上が確認された。

#### 実施例 2. 初発グルコース濃度を高めた場合のアサキドン酸の生産量の評価

(1) グルコース6%、酵母エキス2%、大豆油0.2%及びアデカノール0.01%を含む培地（pH 6.3） (2) グルコース8%、酵母エキス2%、大豆油0.2%及びアデカノール0.01%を含む培地（pH 6.3）、 (3) グルコース11%、酵母エキ

ス 2 %、大豆油 0. 2 % 及び アデカノール 0. 0 1 % を含む培地 ( pH 6. 3 ) 5 L を 1 0 L ジャーファーマンターに入れ、1 2 0 °C で 3 0 分間殺菌した。モルティエレラ属 S A M 2 1 9 7 株 ( F E R M B P - 6 2 6 1 ) の前培養液 1 0 0 ml を植菌し、通気量 1 vvm、攪拌数 3 0 0 rpm、培養温度 2 8 °C で、8 日間の通気攪拌培養を行った。

培養 2 日目、培養 3 日目、培養 4 日目に 2. 0 % グルコースを添加した。培養終了後、実施例 1 と同様の操作により、培地 1 L 当たり ( 1 ) 4 2. 3 g、( 2 ) 6 0. 5 g、( 3 ) 8 3. 1 g の乾燥菌体を得た。実施例 1 と同様に、乾燥菌体 2 0 mg から加水分解、メチルエステル化、及び抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。アラキドン酸の全脂肪酸に対する割合 ( % ) は ( 1 ) 4 0. 7、( 2 ) 3 9. 4、( 3 ) 4 1. 7 であり、アラキドン酸の生産量 ( 培地あたりのアラキドン酸量 ) は ( 1 ) 7. 1 g / L、( 2 ) 9. 8 g / L、( 3 ) 1 4. 3 g / L であった。初発グルコース濃度を高める程アラキドン酸の生産量は向上し、初発グルコース濃度 1 1 % では 1 4. 3 g / L にまで向上した。

#### 実施例 3. 実施例 4 および実施例 5 のためのコントロール

グルコース 6 % 及び酵母エキス 2 % を含む培地 ( pH 6. 0 ) 1 0 0 ml を 5 0 0 ml エルレンマイヤーフラスコに入れ、1 2 0 °C で 2 0 分間殺菌した。実施例 1 で用いたモルティエレラ属 S A M 2 1 9 7 株 ( F E R M B P - 6 2 6 1 ) の孢子溶液 1 0 0  $\mu$ l を植菌し、レシプロシェーカー ( 1 1 0 rpm ) により 2 8 °C で 8 日間振盪培養した。培養後、濾過により菌体を回収し、十分水洗した後、凍結乾燥し、乾燥菌体 3 1 2 0 mg を得た。この菌体より、クロロホルム-メタノール-水の一相系の溶媒を用いる Bligh & Dyer の抽出によっ

て油脂を抽出し、624 mgの油脂が得られた。

この油脂を無水メタノール-塩酸（10%）を用いて50℃にて3時間処理することによってメチルエステル化し、エーテルで抽出して、得られた脂肪酸メチルの組成をガスクロマトグラフィーで分析した結果、パルミチン酸メチル13.3%、ステアリン酸メチル6.1%、オレイン酸メチル15.7%、リノール酸メチル7.2%、 $\gamma$ -リノレン酸メチル4.3%、ジホモ $\gamma$ -リノレン酸メチル4.7%、アラキドン酸メチル42.1%であり、エイコサペンタエン酸は検出されなかった。これを培地当りの生産量に換算するとジホモ $\gamma$ -リノレン酸は0.29 g/L、アラキドン酸は2.63 g/Lであった。

この混合物脂肪酸メチルについて、さらにカラムクロマトグラフィーによって分離し、 $\gamma$ -リノレン酸メチル、ジホモ $\gamma$ -リノレン酸メチル、アラキドン酸メチル画分をそれぞれ分取し、ロータリーエバポレーターによって溶剤を留去した結果、精製された $\gamma$ -リノレン酸メチル、ジホモ $\gamma$ -リノレン酸メチル、アラキドン酸メチルをそれぞれ24.1 mg、26.4 mg、及び236.4 mg 得た。

#### 実施例 4.    $\Delta$ 5 不飽和化酵素阻害剤添加によるジホモ $\gamma$ -リノレン酸の生産

グルコース6%及び酵母エキス2%及び胡麻油2%を含む培地（pH 6.0）2 mlを10 mlエルレンマイヤーフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。実施例1で用いたモルティエラ属SAM 2197株（FERM BP-6261）の孢子溶液50  $\mu$ lを植菌し、レシプロシェーカー（150 rpm）により28℃で8日間振盪培養した。培養終了後、実施例1と同様に濾過、水洗、乾燥、加水分解、メチルエステル化、及び抽出を行い、得られた脂肪酸メチ



ルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。その結果、培地あたり乾燥菌体が 31.2 g/L、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸が 1.41 g/L、アラキドン酸が 0.87 g/L の生産が認められた。この結果から明らかなように、 $\Delta 5$  不飽和化酵素阻害作用を有する胡麻油を培地に添加することにより、アラキドン酸の生産が押さえられ、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸が大量に生産された。

#### 実施例 5. 低温培養によるエイコサペンタエン酸の生産

グルコース 6 % 及び酵母エキス 2 % を含む培地 (pH 6.0) 2 ml を 10 ml エルレンマイヤーフラスコに入れ、120 °C で 20 分間殺菌した。実施例 1 で用いたモルティエラ属 SAM 2197 株 (FERM BP-6261) の孢子溶液 50  $\mu$ l を植菌し、レシプロシェーカー (150 rpm) により 28 °C で 2 日間振盪培養した後、培養温度を 12 °C に下げさらに 6 日間培養した、培養終了後、実施例 1 と同様に濾過、水洗、乾燥、加水分解、メチルエステル化、及び抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。

その結果、パルミチン酸メチル 11.7 %、ステアリン酸メチル 5.8 %、オレイン酸メチル 12.1 %、リノール酸メチル 6.4 %、 $\gamma$ -リノレン酸メチル 4.7 %、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸メチル 4.9 %、アラキドン酸メチル 38.1 %、エイコサペンタエン酸メチル 6.1 % であり、エイコサペンタエン酸が低温培養により生産できることが確かめられた。

PCT 規則第 13 規則の 2 に規定する寄託された微生物への言及及び国際寄託当局

国際寄託当局

名 称 工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名 日本国 305, 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号

寄託された微生物

名 称      Mortierella sp. S A M 2 1 9 7

寄託番号   F E R M   B P - 6 2 6 1

寄託日      1 9 9 7 年 3 月 3 日

## 請 求 の 範 囲

1. 高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物を培養開始時の炭素源濃度が4重量%以上の培地中で培養して、アラキドン酸又はこれを含む脂質を生成せしめ、そしてアラキドン酸を採取することを特徴とするアラキドン酸の製造方法。

2. 高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物を培養開始時の炭素源濃度が4重量%以上の培地中で培養して、アラキドン酸を含む脂質を生成せしめ、そしてアラキドン酸を含む脂質を採取することを特徴とするアラキドン酸を含む脂質の製造方法。

3. 上記モルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物が、モルティエレラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物である請求項1又は2記載の製造方法。

4. 上記モルティエレラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物が、アリアセア (alliacea) 種に属する微生物である請求項3記載の製造方法。

5. 上記モルティエレラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物が、アルピナ (alpina) 種に属する微生物である請求項3記載の製造方法。

6. 上記モルティエレラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物が、モルティエレラ属 SAM 2 1 9 7 株 (FERM BP-6 2 6 1) である請求項3記載の製造方法。

7. 培養開始時の炭素源濃度が8重量%以上であることを特徴とする請求項1乃至6のいずれかに記載のアラキドン酸又はこれを含む脂質の製造方法。

8. 高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物を、培養開始時の炭素源濃度が4重量%以上であり且つ $\Delta 5$ 不飽和化酵素阻害剤を含有する培地中で培養して、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸又はこれを含有する脂質を生成せしめ、そしてジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を採取することを特徴とするジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の製造方法。

9. 高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物を、培養開始時の炭素源濃度が4重量%以上であり且つ $\Delta 5$ 不飽和化酵素阻害剤を含有する培地中で培養して、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を含有する脂質の製造方法。

10. 上記モルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物が、モルティエセラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物である請求項8又は9記載の製造方法。

11. 上記モルティエセラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物が、アリアセア (alliacea) 種に属する微生物である請求項10記載の製造方法。

12. 上記モルティエセラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物が、アルピナ (alpina) 種に属する微生物である請求項10記載の製造方法。

13. 上記モルティエセラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物が、モルティエセラ属 SAM 2197 株 (FERM BP-6261) である請求項10記載の製造方法。

14. 培養開始時の炭素源濃度が8重量%以上であることを特徴とする請求項8乃至13のいずれかに記載のジホモ- $\gamma$ -リノレン酸又はこれを含有する脂質の製造方法。

15. 高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物を、培養開始時の炭素源濃度が4重量%以上の培地中で20℃以下で培養して、エイコサペンタエン酸又はこれを含む脂質を生成せしめ、そしてエイコサペンタエン酸を採取することを特徴とするエイコサペンタエン酸の製造方法。

16. 高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物を、培養開始時の炭素源濃度が4重量%以上の培地中で20℃以下で培養して、エイコサペンタエン酸を含む脂質を生成せしめ、そしてエイコサペンタエン酸を含む脂質を採取することを特徴とするエイコサペンタエン酸を含む脂質の製造方法。

17. 上記モルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物が、モルティエレラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物である請求項15又は16記載の製造方法。

18. 上記モルティエレラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物が、アリアセア (alliacea) 種に属する微生物である請求項17記載の製造方法。

19. 上記モルティエレラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物が、アルピナ (alpina) 種に属する微生物である請求項17記載の製造方法。

20. 上記モルティエレラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物が、モルティエレラ属SAM2197株 (FERM BP-6261) である請求項17記載の製造方法。

21. 培養開始時の炭素源濃度が8重量%以上であることを特徴とする請求項15乃至20のいずれかに記載のエイコサペンタエン酸又はこれを含む脂質の製造方法。

22. 高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエレラ (Mortierella)

11a) 属に属する微生物の菌体を含んでなる動物用飼料。

23. 上記モルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物が、モルティエセラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物である請求項22記載の動物用飼料。

24. 上記モルティエセラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物が、アリアセア (alliacea) 種に属する微生物である請求項23記載の動物用飼料。

25. 上記モルティエセラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物が、アルピナ (alpina) 種に属する微生物である請求項23記載の動物用飼料。

26. 上記モルティエセラ亜属 (Subgenus Mortierella) に属する微生物が、モルティエセラ属 SAM 2197 株 (FERM BP-6261) である請求項23記載の動物用飼料。

27. 前記動物用飼料がさらにその他の飼料成分を含有することを特徴とする請求項22乃至26のいずれかに記載の動物用飼料。

28. 上記動物用飼料が家禽用飼料である請求項22又は27記載の動物用飼料。

29. 上記高度不飽和脂肪酸が、アラキドン酸、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸及び／又はエイコサペンタエン酸である請求項22乃至28のいずれかに記載の動物用飼料。

30. 高濃度の炭素源に耐性を有するモルティエセラ属 SAM 2197 株 (FERM BP-6261)。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00891

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>6</sup> C12P7/64, C12N1/14, A23K1/00 // (C12P7/64, C12R1:645) (C12N1/14, C12R1:645) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> C12P7/64, C12N1/14, A23K1/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), REGISTRY (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZU-YI LI, YINGYIN LU, V.B. YADWAD, O.P. WARD, Process for Production of Arachidonic acid Concentrate by a Strain of Mortierella alpina, The Canadian Journal of Chemical Engineering, Vol. 73, No. 1, p.135-139, February, 1995	1-30
A	JP, 8-214893, A (Omegatech Inc.), August 27, 1996 (27. 08. 96) & EP, 726321, A & US, 5583019, A	1-30
A	JP, 6-153970, A (Suntory Ltd.), June 3, 1994 (03. 06. 94) (Family: none)	1-30
A	JP, 5-91887, A (Suntory Ltd.), April 16, 1993 (16. 04. 93) & EP, 535940, A	1-30
A	JP, 63-14697, A (Suntory Ltd.), January 21, 1988 (21. 01. 88) & EP, 252716, A & US, 5401646, A	1-30
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search March 30, 1998 (30. 03. 98)		Date of mailing of the international search report April 7, 1998 (07. 04. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>8</sup> C12P7/64, C12N1/14, A23K1/00 // (C12P7/64, C12R1:645) (C12N1/14, C12R1:645)		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>8</sup> C12P7/64, C12N1/14, A23K1/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN) REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ZU-YI LI, YINGYIN LU, V. B. YADWAD, O. P. WARD, Process for Production of Arachidonic acid Concentrate by a Strain of Mortierella alpina, The Canadian Journal of Chemical Engineering, Vol. 73, No. 1, p. 135-139, February, 1995	1-30
A	JP, 8-214893, A (オメガテック インコーポレイテッド) 27. 8月. 1996 (27. 08. 96) & EP, 726321, A & US, 5583019, A	1-30
A	JP, 6-153970, A (サントリー株式会社) 3. 6月. 1994 (03. 06. 94) (ファミリーなし)	1-30
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 30. 03. 98		国際調査報告の発送日 07. 04. 98
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 吉住 和之 印 4B 9165 電話番号 03-3581-1101 内線 3449



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 5-91887, A (サントリー株式会社) 16. 4月. 1 993 (16. 04. 93) & EP, 535940, A	1-30
A	JP, 63-14697, A (サントリー株式会社) 21. 1月. 1988 (21. 01. 88) & EP, 252716, A & US, 5401646, A	1-30